

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-266179

(43)Date of publication of application : 15.10.1996

(51)Int.Cl.

A01H 5/00  
C12N 1/13  
C12N 5/10  
C12N 15/09

(21)Application number : 07-050315

(71)Applicant : TOYOTA MOTOR CORP

(22)Date of filing : 16.02.1995

(72)Inventor : TAKABE TETSUKO

(30)Priority

Priority number : 07 34694 Priority date : 01.02.1995 Priority country : JP

## (54) ENVIRONMENTAL STRESS RESISTANT PLANT AND ITS PRODUCTION

(57)Abstract:

PURPOSE: To produce a plant reinforced in resistances to environmental stresses such as a high osmotic pressure, a low temperature, a high temperature and a dryness by introducing a choline dehydrogenase gene, etc., related to the synthesis of glycine betaine, into a plant.

CONSTITUTION: This method for producing a plant reinforced in resistances to objective environmental stresses, comprises introducing a choline dehydrogenase gene and a betaine aldehyde dehydrogenase gene obtained from bacteria and related to the synthesis of glycine betaine into the plant of trees, grasses, etc., such as a tobacco and a rice.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 18.01.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3144260

[Date of registration] 05.01.2001

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-266179

(43) 公開日 平成8年(1996)10月15日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 0 1 H 5/00			A 0 1 H 5/00	A
C 1 2 N 1/13		8828-4B	C 1 2 N 1/13	
5/10		9281-4B	5/00	C
15/09		9162-4B	15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数 2 F D (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平7-50315

(22) 出願日 平成7年(1995)2月16日

(31) 優先権主張番号 特願平7-34694

(32) 優先日 平7(1995)2月1日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000003207

トヨタ自動車株式会社

愛知県豊田市トヨタ町1番地

(72) 発明者 高倍 鉄子

愛知県名古屋市中千種区岡山町1-21-4

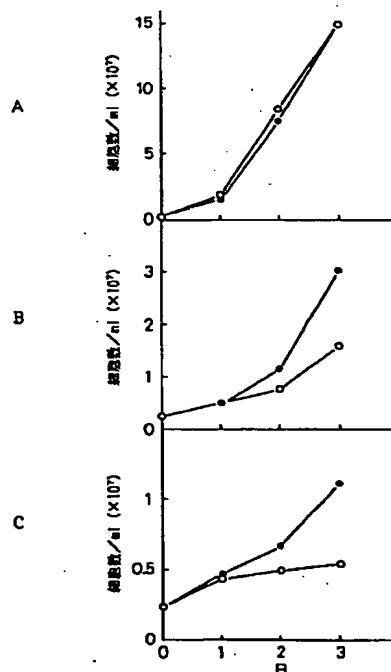
(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

(54) 【発明の名称】 環境ストレス耐性植物及びその作出方法

(57) 【要約】

【目的】 環境ストレスに対する耐性を有する植物の提供。

【構成】 グリシンベタインの合成に関与するコリンデヒドロゲナーゼ遺伝子及びベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子を導入することにより環境ストレスに対する耐性が増強された植物。



**【特許請求の範囲】**

**【請求項 1】** グリシンベタインの合成に関与するコリンデヒドロゲナーゼ遺伝子及びベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子を導入することにより環境ストレスに対する耐性が増強されている植物。

**【請求項 2】** 請求項 1 に記載の植物の作出方法であって、植物に、グリシンベタインの合成に関与するコリンデヒドロゲナーゼ遺伝子及びベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子を導入することを特徴とする方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

**【産業上の利用分野】** 本発明は、種々の環境ストレス、例えば高浸透圧、低温、高温、乾燥等によるストレスに対する耐性が増強された植物、及びその作出方法に関する。

**【0002】**

**【従来の技術】** 自然界に存在する植物は塩ストレス、乾燥ストレス、高温ストレス、低温ストレス等様々な環境ストレスにさらされており、植物は進化の過程で、植物が自生する地域の環境ストレスに対応できるような機構を獲得し、進化してきた。一方、農業の発展と共に交配等人工的手段によって品種改良が行われ、環境ストレスに若干強くなった品種も作られている。しかしながら、砂漠や塩害地ではまだ十分な対応ができていない。

**【0003】** 植物細胞における浸透圧調節には低分子有機化合物の適合溶質の 1 種であるグリシンベタインが関与することが知られている。グリシンベタインの生合成においては、コリンがコリンデヒドロゲナーゼの関与のもとにベタインアルデヒドに転換され、次にベタインアルデヒドがベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼの関与のもとにグリシンベタインに転換されると考えられる。

**【0004】** 近年、遺伝子操作によって環境ストレスに対する耐性を増強した植物を得ようとする研究が活発となっている。例えば、H. J. Bohnert ら、Science Vol. 25 9, No. 22, p508-510 (1993) は、タバコに大腸菌のマンニトール合成酵素を導入し、耐塩性を付与したことを報告している。また、The Plant J. Vol. 6, p749-758 (1994) には、グリシンベタインの合成に関与する遺伝子であるベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子の発現を高め、植物の耐塩性を強化しようとした例が記載されているが、実際にはコリンデヒドロゲナーゼの遺伝子を導入していないので耐塩性の向上につながらなかった。

**【0005】** 前記のごとく、グリシンベタインが植物の環境ストレスの耐性に関与していることは知られているが、いかなる遺伝子を導入すれば植物中のグリシンベタインを増加させることができるか、また外来性遺伝子を人為的に導入することにより植物中のグリシンベタインを増加することにより該植物に環境ストレス耐性を付与することができるか否かについては知られていない。

**【0006】**

**【発明が解決しようとする課題】** そこで本発明は、遺伝子組換え法により環境ストレス耐性を増強した植物、及びその植物の作出方法を提供しようとするものである。

**【0007】**

**【課題を解決するための手段】** 本発明者は、上記の課題を解決するため種々検討の結果、植物細胞の浸透圧調節に関与すると考えられる低分子有機化合物性の適合溶質の 1 種であるグリシンベタインの合成に関与するコリンデヒドロゲナーゼ遺伝子及びベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子の両者を植物に導入することによりグリシンベタインの合成、又はその合成の増強を行うことができ、それにより植物に環境ストレスに対する耐性を付与することができることを見出し、本発明を完成した。

**【0008】** 従って本発明は、グリシンベタインの合成に関与するコリンデヒドロゲナーゼ遺伝子及びベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子を導入することにより環境ストレスに対する耐性が増強された植物を提供する。本発明はまた、上記植物の作出方法であって、植物に、グリシンベタインの合成に関与するコリンデヒドロゲナーゼ遺伝子及びベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子を導入することを特徴とする方法を提供する。

**【0009】**

**【具体的な説明】** 本発明において使用するコリンデヒドロゲナーゼ遺伝子及びベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子の由来生物は特に限定せず、例えば生来的に環境ストレス耐性の高い植物や微生物から得ることができるが、微生物、特に細菌由来の遺伝子が好ましい。特に、大腸菌由来の遺伝子はすでにクローニングされており (Lamark ら、Mol. Microbiol. Vol. 5, p1049-1064, 1991)、本発明においては具体例として大腸菌由来の遺伝子を用いて本発明を具体的に説明する。

**【0010】** しかしながら、本発明の遺伝子は植物細胞内で発現すればよいから、大腸菌由来の遺伝子に限定されない。大腸菌由来の遺伝子は、上記文献の記載に従って、9 kbp の B a m H I 断片として得ることができ、この断片は、コリンデヒドロゲナーゼ遺伝子 (b e t A) 及びベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子 (b e t B) を含んでいる。

**【0011】** 本発明においては、植物として光合成能を有する下等植物である淡水性らん藻シネココッカス属 (Synechococcus) の 1 種を用いるが、グリシンベタインは下等植物であるらん藻類から高等植物にわたって存在しており、植物の環境ストレスに対する耐性に関与していると考えられるから、本発明は広くすべての光合成植物に適用することができる。このような植物としては、例えば、タバコ、トウモロコシ、イネ、小麦、大麦、トマト、ジャガイモ、大豆、ワタ等の草本植物、さらにはユーカリ、アカシア等の木本植物等に広く適用することが可能である。

【0012】前記の遺伝子を前記の植物に導入するには、外来遺伝子を植物細胞に導入するための常用の方法、例えばアグロバクテリウム法、パーティクルガン法等の方法を用いればよい。また外来遺伝子が導入された植物細胞を植物に再生するためにも常用の組織培養による方法を用いることができる。本発明の具体例においては、大腸菌とらん藻細胞との両方において複製することができるシャトルベクターに目的とする遺伝子を挿入し、このベクターをらん藻細胞に導入する方法を用いた。

【0013】多くの植物は、グリシンベタインの生合成能を生来的に有しており、本発明によればそれらの植物においてグリシンベタインの生産能をさらに増強し、環境ストレスに対する耐性を増強することができる。グリシンベタインの生合成能を実質的に有しない植物に本発明を適用することができることは言うまでもない。多くの植物は、グリシンベタインの生合成における中間原料となるコリンの合成能を有しており、このような植物に本発明で用いる前記遺伝子を導入することによりコリンからグリシンベタインの合成を増強することができるが、さらに、本発明で用いる遺伝子を植物細胞に導入することにより、コリンの取り込みが増加するという効果も得られる。

【0014】グリシンベタインは細胞等に存在し、酵素や細胞の構造蛋白質の安定化に寄与すると考えられるから、本発明の植物は、塩などによる浸透圧ストレスのみならず、乾燥ストレス、低温ストレス、高温ストレス等の多様な環境ストレスに対しても耐性を有する。

【0015】

【実施例】次に、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

#### 実施例1 シネココッカス sp. PCC 7942 への遺伝子の導入

##### (1) 遺伝子のクローニング

遺伝子のクローニングはAndresenら、J. Gen. Microbiol. Vol. 134, p1737-1764 (1988) 及び Lamarkら、Mol. Microbiol. Vol. 165, p1059-1062 (1991) に記載されている方法に従って行った。この方法により 9 kb BamHI DNA断片を大腸菌 (CSH 26) から得た。

【0016】このDNA断片は、図1に示すごとく、コリンデヒドロゲナーゼ遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム (bet A)、ベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードするオープンリーディングフレーム (bet B)、及びコリンのエネルギー依存性輸送系をコードするオープンリーディングフレーム (bet T) を含有する。

##### 【0017】(2) 発現シャトルベクターの作製

前記 9 kb BamHI DNA断片をプラスミド pUC 303-Bm の BamHI 部位に挿入することによりプラスミド pBET を得た。プラスミド pUC 303 は大

腸菌/シネココッカスシャトルベクターとして市販されており、pUC 303-Bm は pUC 303 の EcoRI 断片に BamHI 断片を含む 12 bp を導入したプラスミドである。このプラスミド pUC 303-Bm の BamHI 部位に、前記プラスミド pBET 中の 9 kb BamHI 部位を挿入することにより 20 kb のプラスミド pCBET を得た。なお、上記の遺伝子組換え操作は宿主として大腸菌 DH5  $\alpha$  を用いて行った。

##### 【0018】(3) らん藻類の形質転換

らん藻の遺伝子操作で一般的に用いられているシネココッカス (*Synechococcus*) sp. PCC 7942 を 20 mM の HEPES-KOH (pH 8.0) を追加した BG11 液体培地 (組成:  $\text{NaNO}_3$ ; 1.5 g/l,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 40 mg/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 75 mg/l,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 36 mg/l, Citric Acid; 6 mg/l, Ferric Ammonium Citrate; 6 mg, EDTA; 1 mg/l,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 20 mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2.5 mg,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 222  $\mu\text{g}$ /l,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 79  $\mu\text{g}$ /l,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 2.86 mg/l,  $\text{NaMoO}_4$ ; 21  $\mu\text{g}$ /l,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 500  $\mu\text{g}$ /l) 中で、30℃にて蛍光白色光の連続照射のもとで培養した。培養したらん藻体とシャトルプラスミド pCBET とを混合することにより形質転換し、ストレプトマイシン耐性により選択した。10  $\mu\text{g}$ /ml のストレプトマイシンの存在下で増殖するらん藻を選択した。生成したコロニーを、 $^{32}\text{P}$ -標識した前記 9 kb DNA断片 (図1) をプローブとして用いて Southern ハイブリダイゼーションによりスクリーニングし、陽性クローンを選択した。

【0019】次に、目的とする遺伝子の発現を確認するため、培養したらん藻細胞から、H. Aiba ら、J. Biol. Chem. Vol. 256, p11905-11910 (1981) に記載されている方法により全 RNA を抽出し、そして Yang H. ら、Nucleic Acids Research vol. 21, p3337-3338 (1993) に記載の方法により、プローブとして  $^{32}\text{P}$ -標識した PstI 及び BglII 断片 (図1を参照のこと) を用いて Northern プロット分析により転写された RNA の検出を行った。この試験においては、前記の選択された陽性クローンを NaCl を含有しない培地で2日間培養し、さらに 200 mM NaCl を含有する BG11-コリン培地で培養した後、検出を行った。

【0020】図2のレーン2に示すように、本発明のらん藻については約 9 kb の RNA 転写物が検出されたが、遺伝子の挿入を行わなかったプラスミドベクター pUC 303-Bm により形質転換された細胞については、図2のレーン1に示すごとく、プローブとハイブリダイズする RNA は転写されなかった。転写された RNA のサイズが約 9 kb であることから、挿入した 9 kb DNA断

片が転写されたものと推定される。

#### 【0021】実施例2 形質転換された植物の特性

##### (1) コリンの取り込み

ベクタープラスミド pUC303-Bm 又はプラスミド pCBET により形質転換されたシネコッカスの細胞を、200mM NaCl を含有するか又は含有しない BG11 培地において対数増殖中期まで増殖せしめた。コリン輸送活性 (コリンの取り込み) は 25℃ にて、Lamark ら、Mol. Microbiol. Vol. 5, p1049-1064 (1991) に記載されている方法により、10 $\mu$ M [<sup>14</sup>C]-コリン (58.5mCi/mmol) を用いて行った。なお、コリンの非存在下に増殖した藻体中には内因性コリンは検出されなかった。この結果を図3に示す。

【0022】図3のAに示すごとく、対象細胞 (pUC303-Bm により形質転換された細胞) 及び bet 遺伝子含有細胞 (pCBET により形質転換された細胞) のいずれにおいても、非ストレス条件下でコリンの取り込みが進行したが、初速度及び30分後の細胞内コリン含量は pCBET 担持細胞において約40%高かった。この差は、大腸菌中で活性なコリン輸送系 (Lamark T. ら、Mol. Microbiol. Vol. 5, p1049-1064 (1991)) をコードしている、pCBET 中の bet 遺伝子が機能的に発現した結果であろう。すべての場合において、カルボニルシアニド- $\rho$ -トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン (FCCP) の5 $\mu$ Mの添加によりコリンの取り込みが強く阻害され、シネコッカスにエネルギー依存性コリン輸送系が存在することが示唆された。

【0023】なお、図3中で、中空円は pUC303-Bm で形質転換された細胞を FCCP の非存在下で培養した場合の結果を示し、中空四角は pCBET により形質転換された細胞を FCCP の非存在下で培養した場合の結果を示し、黒円は pUC303-Bm で形質転換された細胞を FCCP の存在下で培養した場合の結果を示し、そして黒四角は pCBET により形質転換された細胞を FCCP の存在下で培養した場合の結果を示す。

【0024】図3のBに示すように、塩ストレス条件下では、コリンは pCBET により形質転換されたシネコッカスによってのみ取り込まれた。これは、シネコッカスの原形質膜に存在するエネルギー依存性コリン輸送系が培地中の高濃度の存在によって変化し、他方グリシンベタインの合成が膜を安定化し高温濃度条件下でコリンの輸送を可能にしたためと予想される。この場合、グリシンベタイン合成におけるコリンの使用によって、bet 遺伝子含有細胞中での輸送系のコリンによるフィードバック抑制が解除されたためかも知れない。

##### 【0025】(2) グリシンベタインの生産

形質転換されていないシネコッカス s.p. PCC7942 中にはコリンデヒドロゲナーゼ及びベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼの両酵素活性は検出されず、そして塩条件下でグリシンベタインは全く蓄積しなかった。

1mMより高濃度のコリンの添加によってシネコッカス s.p. PCC7942 細胞の増殖は非ストレス条件下及びストレス条件下で阻害されたので、pCBET で形質転換された細胞でのグリシンベタインの生産のために100 $\mu$ Mのコリンを加えた。

【0026】このレベルのコリンは、種々の条件下で対象細胞の増殖に影響を与えなかった。100 $\mu$ Mのコリンを含有するBG11培地 (BG11-コリン培地) 中で2日間 (対数増殖中期まで) 増殖したシネコッカスの細胞を、種々のNaCl濃度を有するBG11-コリン培地に移した。3日間のインキュベーションの後、第四アンモニウム化合物を1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>により細胞から抽出し、そしてその過ヨウ素酸塩として沈殿させた (Wall, JS ら、Anal. Chem. Vol. 32, p870-847 (1960) を参照のこと)。ペレットを、内部標準としての600 $\mu$ Lの $t$ -ブタノール含有D<sub>2</sub>Oに溶解した。

【0027】第四アンモニウム化合物の分析を、<sup>1</sup>H NMRスペクトル法によりJEOL JMN-500 フーリエ交換NMR計を用いて行った。細胞の体積は Blumwald ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 80, p2599-2602 (1983) に記載されている方法により測定した。濃縮された細胞を、膜不透過性常磁性消去剤 Na<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (20mM) 及び Na<sub>2</sub>Mn EDTA (75mM) の存在下で1mMの自由に透過するニトロキサイドスピンプローブ THMPONE (2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリドン-N-オキシル) により処理し、細胞内スピンプローブのESRシグナルを励起した。細胞体積はまた、<sup>3</sup>H<sub>2</sub>O 及び [<sup>14</sup>C]-ソルビトールを用いて、Incharoensakidi A. ら、Plant Cell Physiol. Vol. 29, p1073-1075 (1988) の方法によっても測定した。

【0028】結果を図4に示す。図4においてAは対象 (pUC303-Bm により形質転換された細胞) からの四級アンモニウム化合物の<sup>1</sup>H NMRスペクトルを示し、 $\beta$ は pCBET により形質転換された細胞からのそれを示す。ピーク b 及び c がそれぞれベタイン及びコリンを示す。図4から明らかなように pCBET により形質転換された細胞のみがグリシンベタインを合成しそして蓄積した。

【0029】これらの細胞中のグリシンベタインのレベルは培地中の塩濃度により変化し、表1に示すように、非ストレス条件下での約3mMから、NaCl濃度375mMでの45mMにわたった。これらのレベルのグリシンベタインは種々の細胞機能に十分な保護効果を与える (Gerard H. ら、Plant Cell Physiol. Vol. 29, p1073-1075 (1991)、及び Rhodes D. ら、Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. Vol. 44, p357-384 (1993) を参照のこと)。

##### 【0030】

##### 【表1】

培地中NaCl濃度 (M)	ベタイン (mM)
0	3.2±0.4
0.1	4.5±0.6
0.2	8.8±0.7
0.3	24.1±2.0
0.375	45.1±1.9

### 【0031】 (3) 光合成活性

BG11-コリン培地中で2日間(対数増殖期中期)増殖した細胞を、200mM NaClを添加したBG11-コリン培地に移し、そして4日間培養を続けた。これらの細胞の光合成活性は低かったので、NaClを含有しない新鮮なBG11-コリン培地に1日間移した後、光合成による酸素の発生並びにPSI(光化学系I)及びPSII(光化学系II)を、Clark-タイプ酸素電極中で測定した。

【0032】反応媒体は100μMのDCMU(3-(3,4-ジクロロフェニル)-ジメチル尿素)、1mMのアスコルビン酸ナトリウム、500μMのDAD(2,3,5,6-テトラメチル-β-フェニレンジアミン)、及びPSI電子輸送活性の測定のためには400μMのMV(メチルビオローゲン)又はPSII電子輸送活性の測定のためには1mMのPBQ(フェニル-1,4-ベンゾキノン)を含有していた。光合成活性はま

た、細胞を200mM NaClの存在下での浸透圧ストレスにかけた直後にも測定した。

【0033】シネコッカスは400mMという高濃度でNaClを含有する培地中で増殖することができるが、300mMのNaClの存在下で4日間の増殖の後細胞は淡黄色に変色した。この効果はpCBETにより形質転換された細胞においては観察されず、緑色のままであった。この結果を白黒写真として図6に示す。図6において、右側はpCBETにより形質転換されたシネコッカスの培養物の写真であり、左側は対照培養物の写真である。

【0034】予想通り、pCBETにより形質転換された細胞に比べてpUC303-Bmにより形質転換された細胞において、吸収スペクトルは、フィコビリゾーム(Phycobilisome)[C-フィコシアニン(λ620-630nm)]及びクロロフィル含量の劇的な低下を示した(データは示さず)。光合成によるO<sub>2</sub>の発生並びにPSI及びPSIIに関連する活性のいずれもが、pUC303-Bmにより形質転換された対照細胞に比べてpCBETにより形質転換された細胞において高かった。この結果を表2に示す。なお、表2の値は3回の測定値の平均であり、その標準誤差は5%以内であった。

### 【0035】

#### 【表2】

反応	酸素の発生又は吸収 (μmol O <sub>2</sub> /mg Chl/h)	
	pUC303-Bm 形質転換細胞	pCBET形質転換細胞
Total (H <sub>2</sub> O→CO <sub>2</sub> )	81(100)	98(121)*
PSI (DADH <sub>2</sub> →MV)	145(100)	165(114)
PSII (H <sub>2</sub> O→PBQ)	156(100)	217(139)

【0036】下記の表3は、非ストレス条件下で増殖した細胞を高塩濃度条件(200mM NaCl)に移した後に得られた光合成活性を示す。いずれの測定値も(特にPSIのそれは)、対照細胞においては、塩ストレス非存在下において得られた値に比べてほとんど瞬間的に低下した。この低下は、pCBETにより形質転換された

細胞においては顕著でなかった。なお表3の値は3回の測定値の平均であり、その標準誤差は5%以内であった。

### 【0037】

#### 【表3】

反応	酸素の発生又は吸収 (μmol O <sub>2</sub> /mg Chl/h)			
	pUC303-Bm 形質転換細胞		pCBET形質転換細胞	
	-NaCl	+0.2M NaCl	-NaCl	+0.2M NaCl
Total (H <sub>2</sub> O→CO <sub>2</sub> )	57(100)	40(68)*	52(100)	39(74)*
PSI (DADH <sub>2</sub> →MV)	152(100)	96(63)	217(100)	177(82)
PSII (H <sub>2</sub> O→PBQ)	71(100)	60(85)	78(100)	77(98)

【0038】これらの観察結果が示すところによれば、グリシンベタインの生産が、塩ストレス条件下でフィコビリゾーム及びPS複合体に対して安定化効果をもたらす。

す。

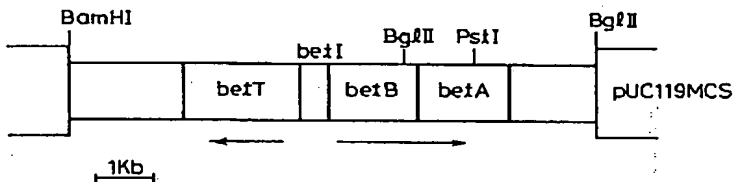
【0039】(4) 塩ストレス条件下での増殖  
pUC303-Bmで形質転換された細胞(対照)及び

pCBETにより形質転換された細胞をBG11-コリン培地中で2日間増殖させた後、種々のNaCl濃度のBG11-コリン培地中で増殖せしめた。対照細胞及びpCBETで形質転換された細胞のいずれも0.3M NaClまではほとんど同じ増殖速度を示した。しかしながら、0.3Mより高いNaCl濃度において、pCBETで形質転換された細胞は対照細胞に比べて増殖速度が高かった(図5のB及びC)。図5中、AはNaCl濃度0.1M、Bは0.375M、Cは0.4Mの結果を示す。総合的な結果が示すところによれば、プラスミドpCBET中に存在するbet遺伝子はシネコкокカス細胞中で発現され、そして機能的蛋白質が生成した。さらに、細胞により生産されたグリシンベタインは、塩ストレス条件下でシネコкокカス細胞に一般的に有利な効果を生じさせた。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は本発明において用いる遺伝子群の配置を

【図1】



示す図である。

【図2】 図2は、シネコкокカスに導入された遺伝子から転写された約9kbのmRNAをNorthernブロット法により検出した電気泳動図であって図面代用写真である。

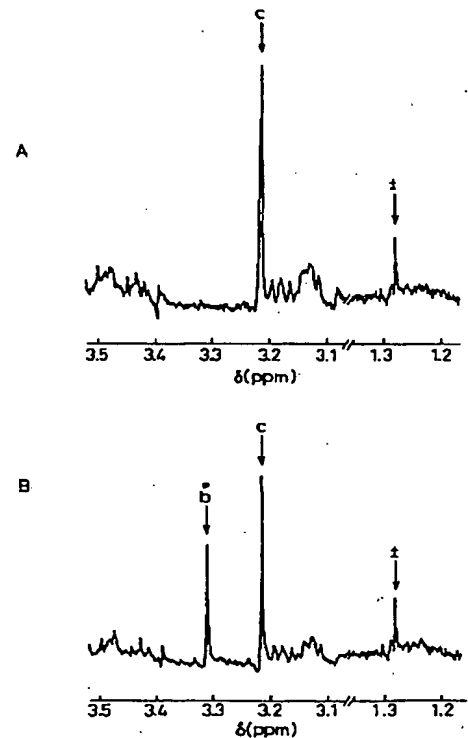
【図3】 図3は、種々の条件でのコリンの取り込みを示すグラフである。

【図4】 図4は、形質転換された細胞中にグリシンベタイン (b) が生成したことを示すNMRスペクトル図である。

【図5】 図5は種々のNaCl濃度でのシネコкокカスの増殖を示すグラフである。

【図6】 図6において、右側はpCBETにより形質転換されたシネコкокカスの培養物の写真であり、左側は対照培養物の写真である。いずれも生物の形態を表す図面代用写真である。

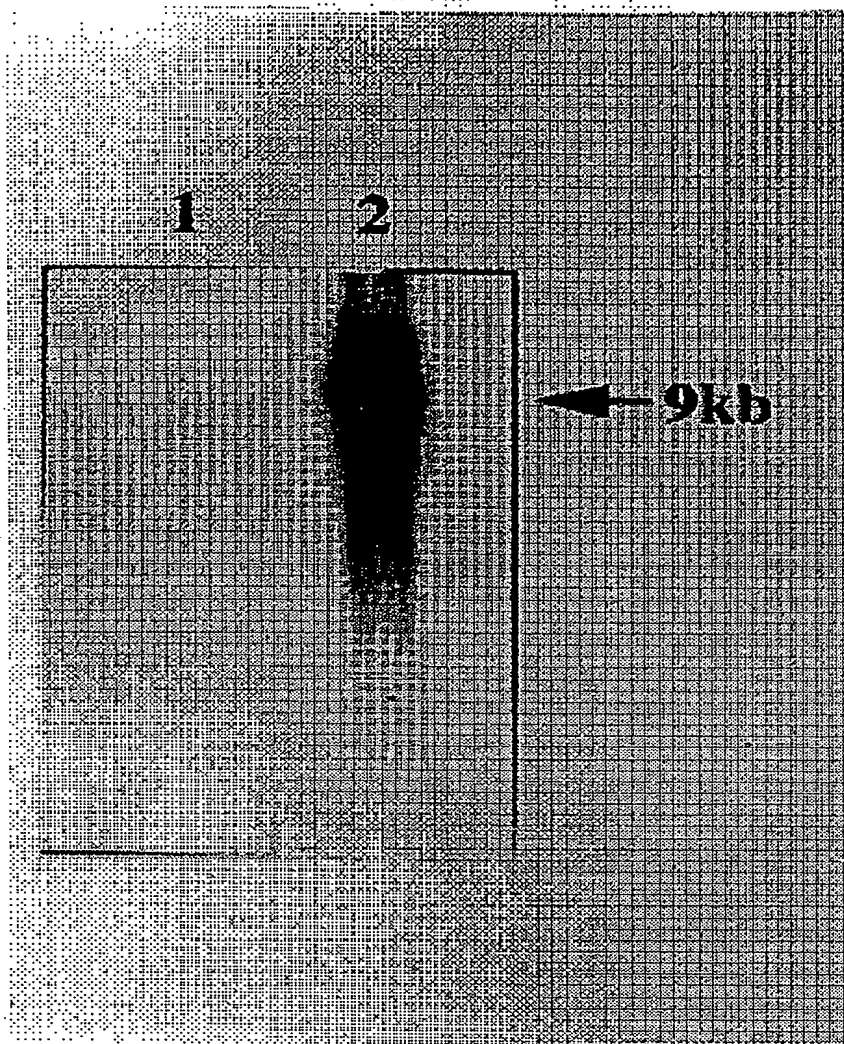
【図4】





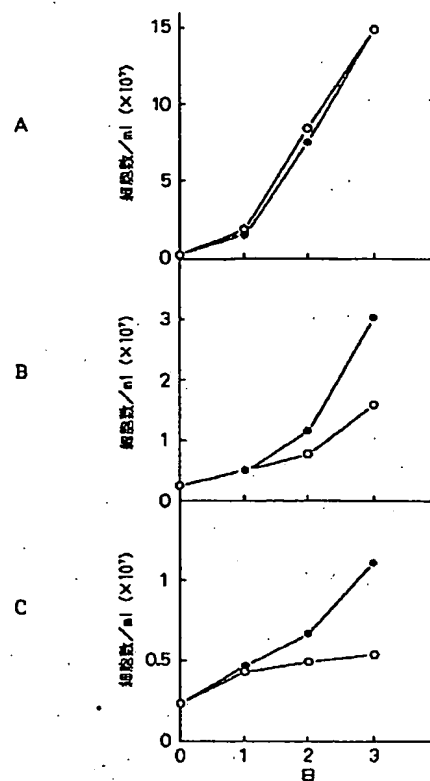
【図2】

図2 代用写真

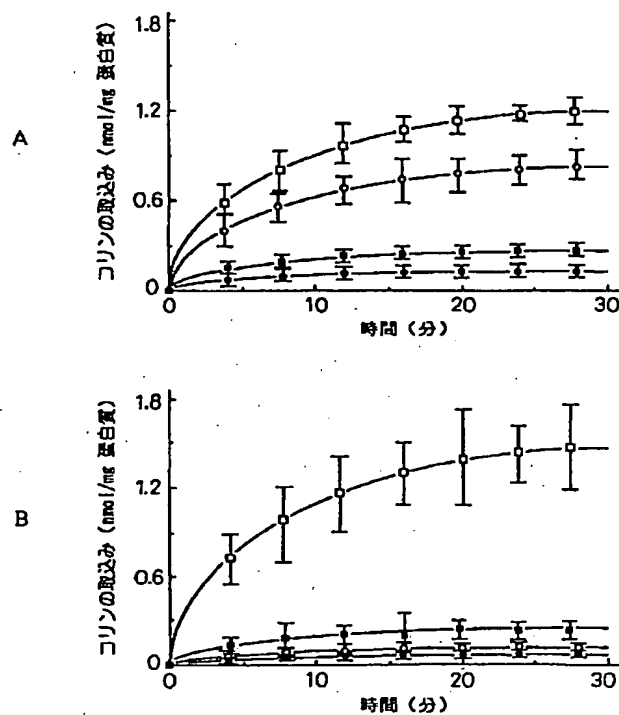


写真

【図5】

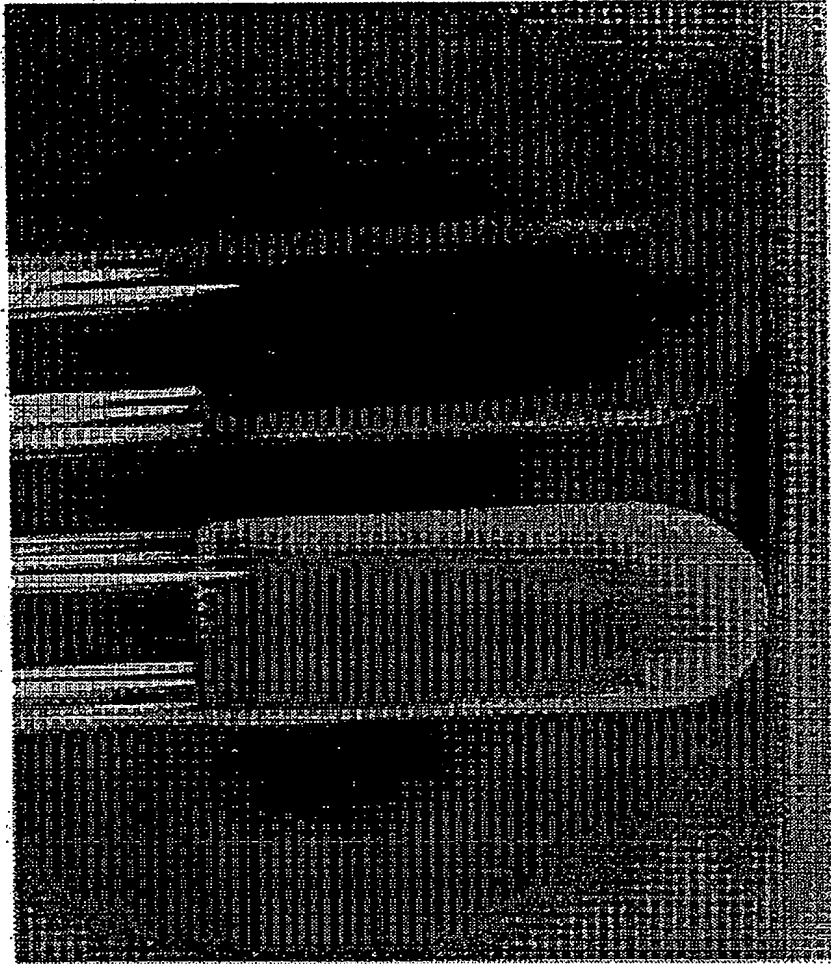


【図 3】



【図 6】

図面代用写真



写真